



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 13/00 C12P 21/08, A61K 37/02, 39/395 G01N 33/577, C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/21314 (43) Date de publication internationale: 28 octobre 1993 (28.10.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00382 (22) Date de dépôt international: 19 avril 1993 (19.04.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/04827 21 avril 1992 (21.04.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : SCHWEIGHOF-FER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 259, boulevard Périère, F-75017 Paris (FR).	(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: PEPTIDES HAVING A GDP EXCHANGE FACTOR ACTIVITY, NUCLEIC ACID SEQUENCES CODING FOR SAID PEPTIDES, PREPARATION AND UTILIZATION (54) Titre: PEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE FACTEUR D'ECHANGE DU GDP, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES PEPTIDES, PREPARATION ET UTILISATION (57) Abstract The present invention relates to peptides capable of modulating the levels of GDP exchange on p21-GDP complexes, the nucleic acid sequences coding for said peptides, preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them. (57) Abrégé La présente invention concerne des peptides capables de moduler les niveaux d'échange du GDP sur des complexes p21-GDP, les séquences d'acides nucléiques codant pour ces peptides, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LJ	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE FACTEUR D'ECHANGE DU GDP.
SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES PEPTIDES.
PREPARATION ET UTILISATION

La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et
nucléotidiques, et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, l'invention
concerne des peptides capables de moduler les niveaux d'échange du GDP sur des
complexes p21-GDP.

Les produits des gènes ras, généralement désignés protéines p21, jouent un
rôle clé dans le contrôle de la division cellulaire chez tous les organismes eucaryotes
où ils ont été recherchés. Certaines modifications spécifiques de ces protéines leur
font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un
grand nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras
modifiés. De même, une surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un
dérèglement de la prolifération cellulaire. La compréhension du rôle exact de ces
protéines p21 dans les cellules, de leur mode de fonctionnement et de leurs
caractéristiques constitue donc un enjeu majeur pour la compréhension et l'approche
thérapeutique de la cancérogénèse.

In vivo, on ne connaît pas encore la nature exacte des événements
responsables de l'activation des protéines p21. On sait qu'elles exercent leurs
fonctions en oscillant entre deux états conformationnels : une forme inactive liée au
GDP et une forme active liée au GTP, mais les facteurs agissant sur la transition entre
ces deux formes ne sont pas clairement identifiés. Des travaux récents rapportent des
situations physiologiques au cours desquelles la proportion de protéines ras liées au
GTP augmente dans la cellule. Il s'agit de l'activation des lymphocytes T et de la
stimulation des fibroblastes 3T3 par des facteurs de croissance dont l'EGF et le PDGF
(Downward et al., Nature 346 (1990) 719 ; Gibbs et al., J. Biol. Chem. 265 (1990)
20437). L'augmentation de la proportion de p21-GTP peut s'expliquer au moins en
partie par l'action d'une protéine jouant un rôle analogue à celui d'un récepteur pour
les protéines G de transduction. A cet égard, certaines protéines capables de
promouvoir l'échange du GDP sur les protéines p21 ont été identifiées, à partir de
cerveau de boeuf [West et coll., FEBS Lett. 259 (1990) 245] et de rat [Wolfman et
Macara, Science 248 (1990) 67]. La localisation cellulaire distincte de ces facteurs et
les conditions expérimentales très différentes dans lesquelles ils ont été obtenus

laissent supposer qu'il s'agit de protéines différentes. Elles sont aussi actives sur les protéines ras normales que sur celles qui sont oncogéniques. Ces activités sont regroupées sous le terme de GEF : Facteur d'Echange des nucléotides Guanidiques, ou GRF.

5 Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité GRF a été attribuée au produit du gène CDC25 [Camonis et al., EMBO J. 5 (1986) 375], et des études ont été réalisées afin de comprendre la voie de signalisation faisant intervenir le produit des gènes CDC25, RAS1 et RAS2 d'une part et l'adénylate cyclase d'autre part chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En particulier, de nombreux travaux ont été
10 focalisés sur la caractérisation du produit du gène CDC25 qui était l'élément le plus mal connu de cette chaîne. Le produit du gène CDC25 constitue l'élément le plus en amont de la cascade de réactions conduisant à l'activation de la p21 chez la levure. Les travaux réalisés dans ce domaine ont contribué à démontrer que le produit de ce gène devait agir comme facteur d'échange GDP -> GTP pour activer les protéines ras.
15 Un second gène de la levure *S.cerevisiae*, SDC25, structuellement très voisin de CDC25, a été isolé et caractérisé. Le domaine actif de SDC25 semble être un facteur d'échange capable d'agir *in vitro* et *in vivo* sur les protéines ras. Ce domaine constitue le premier constituant moléculaire décrit doué de cette activité.

20 Très récemment, une protéine de type GRF a été également mise en évidence chez la souris [Vanoni et Martegani, J. Cell. Bioch. Suppl. 16B (1992) 220].

Toutefois, jusqu'à aujourd'hui, aucune activité GRF n'a été isolée et caractérisée chez l'homme. La présente invention résulte précisément de la démonstration par la demanderesse de l'existence d'un facteur humain d'échange du GDP. La présente invention résulte plus particulièrement de l'identification, de
25 l'isolement et de la caractérisation de peptides et de séquences nucléotidiques d'origine humaine, désignés hGRF et hSOS, capables de moduler l'état d'activation des protéines p21.

Un premier aspect de l'invention consiste donc en des peptides utilisables pharmaceutiquement. Plus particulièrement, un objet de l'invention réside dans des
30 peptides capables de moduler les niveaux d'échange du GDP sur des complexes p21-GDP. Il est entendu que p21 désigne tout produit d'expression d'un gène ras normal ou oncogénique.

Plus particulièrement, les peptides de l'invention sont choisis parmi tout ou partie des séquences SEQ ID n° 2, 3, 4, 6 ou 8 ou d'un dérivé de celles-ci.

5 Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de ces séquences et conservant l'activité recherchée. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son site d'interaction, celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa
10 résistance à des protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

Dans un mode particulier de l'invention, les peptides de l'invention sont des peptides capables de stimuler l'échange du GDP sur le complexe p21-GDP.

15 Dans un autre mode particulier de l'invention, les peptides de l'invention sont des peptides capables de ralentir ou d'inhiber l'échange du GDP sur le complexe p21-GDP. De tels peptides sont préférentiellement des peptides capables d'antagoniser l'interaction du facteur d'échange du GDP avec le complexe p21-GDP. Il peut donc s'agir de fragments des séquences indiquées ci-dessus ou de dérivés de celles-ci. De
20 tels fragments peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent être synthétisés par voie chimique, sur la base des séquences données dans la présente demande, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché. Dans ce
25 cas, la séquence nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la présente demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également être préparée à partir des séquences données dans la présente demande (SEQ ID n° 1, 5 et 7), par coupures enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques
30 connues de l'homme du métier, ou par criblage de banques d'ADN avec des sondes élaborées à partir de ces séquences. Par ailleurs, les peptides de l'invention capables de ralentir ou d'inhiber l'échange du GDP sur le complexe p21-GDP peuvent également être des peptides ayant une séquence correspondant au site d'interaction du facteur d'échange sur le complexe p21-GDP.

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragments d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un peptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier, compte tenu des enseignements donnés dans la présente demande. En particulier, ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un peptide de l'invention, prélèvement du sang, et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art.

Plus préférentiellement, les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention présentent la capacité d'inhiber au moins partiellement l'interaction du facteur d'échange avec le complexe p21-GDP. Ils peuvent ainsi être utilisés pour réguler l'état d'activation du produit des gènes ras.

Par ailleurs, ces anticorps peuvent également être utilisés pour détecter et/ou doser le facteur d'échange du GDP humain dans des échantillons biologiques, et de ce fait, pour renseigner sur l'état d'activation du produit des gènes ras.

La présente invention permet donc de générer des peptides dérivés des séquences SEQ ID n° 2-4, 6 et 8, ainsi que des anticorps dirigés contre ces peptides, présentant des propriétés biologiques intéressantes en vue d'une utilisation pharmaceutique. L'activité biologique des différents peptides et anticorps de l'invention sur l'échange du GDP peut être évaluée de différentes façon ainsi qu'illustré dans les exemples.

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules inhibitrices de la voie de signalisation dépendante des protéines ras non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide de l'invention tel que décrit ci-avant pour la préparation de molécules non-peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement sur les niveaux d'échange du GDP, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

La présente invention a également pour objet toute séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus. Plus préférentiellement, il s'agit d'une séquence choisie parmi :

5 (a) tout ou partie des séquences SEQ ID n° 1, 5 ou 7 ou de leur brin complémentaire,

(b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide selon l'invention, et

(c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

10 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base des
15 séquences SEQ ID n° 1, 5 ou 7. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaires connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, notamment selon la méthode des phosphoramidites, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification
20 chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Ces séquences nucléotidiques selon l'invention sont utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit pour la production in vitro des peptides de l'invention, soit pour la réalisation de séquences antisens ou pour la production des peptides de l'invention dans le cadre d'une thérapie génique, soit encore pour la détection et le
25 diagnostic, par des expériences d'hybridation, de l'expression ou d'une surexpression d'un facteur d'échange du GDP amplifié, muté ou réarrangé dans des échantillons biologiques ou pour l'isolement de séquences homologues à partir d'autres sources cellulaires.

Pour la production des peptides de l'invention, les séquences nucléiques
30 définies ci-dessus sont généralement placées sous le contrôle de signaux permettant leur expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, sequence "leader" de sécrétion, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Préférentiellement, ces séquences nucléotidiques de l'invention font

partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent également servir à la réalisation d'oligonucléotides antisens ou d'antisens génétiques utilisables comme agents pharmaceutiques. L'inhibition de l'expression de certains oncogènes par des séquences antisens s'est avérée être une stratégie utile dans la compréhension du rôle de ces oncogènes et une voie particulièrement prometteuse dans la réalisation d'un traitement anticancéreux. Les séquences antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaire du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les séquences antisens capables d'inhiber au moins partiellement la production de peptides stimulant l'échange du GDP sur des complexes p21-GDP. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie des séquences nucléiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides stimulant l'échange du GDP. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus à partir des séquences SEQ ID n° 1, 5 ou 7, par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique. De telles séquences peuvent être utilisées dans le cadre de thérapies géniques, pour le transfert et l'expression in vivo de séquences antisens ou de peptides capables de moduler les niveaux d'échanges du GDP sur les protéines ras. A cet égard, les séquences peuvent être incorporées dans des vecteurs, notamment d'origine virale.

L'invention concerne également, comme séquences nucléotidiques, les sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hydrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour un peptide de l'invention, ou avec l'ARNm correspondant. De telles sondes peuvent être utilisées in vitro comme outil
5 de diagnostic, pour la détection de l'expression du facteur d'échange du GDP, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). De telles sondes doivent être préalablement marquées, et pour cela différentes techniques sont connues de l'homme du métier. Les conditions d'hybridation dans lesquelles ces sondes peuvent être
10 utilisées sont les conditions normales de stringence (voir notamment les techniques générales de clonage ci-après ainsi que les exemples). Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour un peptide de l'invention, à partir d'autres sources cellulaires, ainsi qu'illustré dans les exemples.

15 L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un peptide tel que défini ci-avant.

Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps et/ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-avant, ainsi que toute composition pharmaceutique comprenant comme
20 principe actif au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps et séquence nucléotidique définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées
25 pour moduler l'activation des protéines p21 et de ce fait pour moduler la prolifération de certains types cellulaires. Plus particulièrement, ces compositions pharmaceutiques sont destinées au traitement de cancers. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du
30 pancréas, dont 90 % ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon [Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549], les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50 %), ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes [30 %, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682].

L'invention a encore pour objet l'utilisation des molécules décrites ci-avant pour moduler l'activité des protéines p21. En particulier, l'invention concerne l'utilisation de ces molécules pour inhiber au moins partiellement l'activation des protéines p21.

5 L'invention fournit également un procédé de détection de l'expression et/ou d'une surexpression d'un gène ras dans un échantillon biologique. Un tel procédé comprend par exemple la mise en contact d'un tel échantillon avec un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'invention, la révélation des complexes antigène-anticorps, et la comparaison des résultats obtenus avec un échantillon standard. Dans
10 un tel procédé, l'anticorps peut être en suspension ou préalablement immobilisé sur un support. Ce procédé peut également comprendre la mise en contact de l'échantillon avec une sonde nucléotidique selon l'invention, la mise en évidence des hybrides obtenus, et la comparaison avec ceux obtenus dans le cas d'un échantillon standard.

La présente invention peut être utilisée dans le domaine thérapeutique : les
15 peptides, anticorps et séquences nucléotidiques de l'invention étant capables de moduler l'activité des gènes ras, ils permettent en effet d'intervenir dans le processus de développement des cancers. Ainsi qu'illustré dans les exemples, les séquences nucléotidiques de l'invention permettent notamment d'exprimer des peptides capables de compléter la thermosensibilité de levures portant une mutation cdc25. Elles
20 permettent également d'exprimer des peptides capables de supprimer une mutation dominante RAS2ts, démontrant une compétition avec le produit normal d'expression du gène CDC25 pour l'interaction avec les protéines p21. L'invention peut également être utilisée dans le domaine du diagnostic et du typage de cancers : les anticorps et sondes nucléotidiques de l'invention permettent en effet l'identification des cancers
25 dans lesquels un gène ras est impliqué ainsi que le diagnostic de cancers liés à la surexpression d'un gène ras normal ou oncogénique.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

30 Figure 1 : Test de transactivation : Cette figure présente en ordonnée les niveaux d'activité CAT (% par rapport au bruit de fond) des souches CHO recombinantes, en fonction de la séquence d'ADNc utilisée pour la transformation.

Figure 2 : Test d'activité d'échange du GTP : Cette figure présente en ordonnée le rapport des formes p21-GDP/p21-GTP des souches CHO recombinantes, en fonction de la séquence d'ADNc utilisée pour la transformation.

5 Figure 3 : Test d'activité d'échange du GDP *in vitro* : Cette figure montre, en fonction du temps et pour 2 concentrations d'un peptide de l'invention, la diminution de la proportion de GDP rstant lié à la protéine p21.

Techniques générales de clonage

10 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien
15 connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

20 Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322, pUC, λ gt11, pGEX 2T et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale.

25 Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

30 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

5 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

10 La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence normales sont généralement les suivantes : hybridation : 3 x SCC en présence de 5 x Denhart's à 65°C ; lavage : 0,5 x SSC à 65°C.

15 1. Isolement du gène du facteur humain d'échange du GDP (hGRE)

5.10⁵ phages d'une banque de cerveau humain construite dans le vecteur λ gt11 [Skolnik et al., Cell 65 (1991) 83] ont été criblés selon les techniques décrites par Sambrook, Fritsch et Maniatis (Molecular cloning ; Cold Spring Harbor Laboratory Press ; 1989).

20 La sonde utilisée pour le criblage de cette banque est un fragment d'ADNc humain de 137 paires de bases marqué au ³²P. Cette sonde a été préparée par PCR sur l'ADN total de la banque précitée en utilisant comme amorces les oligonucléotides dégénérés suivants :

-ATC CGT CAG GTA CAT CCC CAG GTA TGG CAC ACA

25 T T T T T T
 A A A A G A
 G G G

pour l'oligonucléotide de l'extrémité 3' du fragment, et

-GCA ATT TTT CGG CTT AAG AAG ACT TGG

30 T C C A C A A C
 C A T G A
 G C A G

pour l'oligonucléotide de l'extrémité 5' du fragment.

La sonde a été marquée au ^{32}P par "random priming" selon la technique de Feinberg et Vogelstein [Anal. Biochem. 137 (1984) 266], et la réaction de PCR a été menée à 40°C environ dans les conditions décrites dans les techniques générales de clonage.

- 5 Parmi les différents clones positifs obtenus par hybridation avec cette sonde, un comprend la totalité d'une phase ouverte qui porte l'activité d'échange vis-à-vis de Ha-Ras.

10 Ce clone de $\lambda\text{gt}11$ contient un ADNc de 3 kb qui a été introduit, sous forme d'un fragment EcoRI, au site correspondant d'un vecteur M13mp18. Cet ADNc a ensuite été séquencé à l'aide des amorces commerciales "reverse" et "-20" ainsi qu'à l'aide d'oligonucléotides spécifiques selon la technique de Sanger (Cf techniques générales de clonage).

15 La séquence nucléotidique du gène du facteur humain d'échange du GDP porté par le fragment ainsi obtenu est présentée sur la séquence SEQ ID n° 1, ainsi que les séquences peptidiques déduites (SEQ ID n° 2, 3 et 4).

2. Préparation de sous fragments

20 Différents dérivés ou fragments du gène ainsi obtenu peuvent être préparés et utilisés, notamment pour l'expression de peptides de l'invention. En particulier, les fragments suivants ont été préparés par coupure enzymatique, et séparés par électroélution :

- un fragment PstI-EcoRI comprenant une partie de la région codante du facteur d'échange (du nucléotide 936 jusqu'au codon stop) ainsi que la région 3' non codante du fragment,
- 25 - un fragment EcoNI-EcoRI comprenant une partie de la région codante du facteur d'échange (du nucléotide 910 jusqu'au codon stop) ainsi que la région 3' non codante du fragment,
- un fragment EagI-EcoRI comprenant une partie de la région codante du facteur d'échange (du nucléotide 638 jusqu'au codon stop) ainsi que la région 3' non codante du fragment,
- 30 - un fragment BalI-EcoRI comprenant une partie de la région codante du facteur d'échange (du nucléotide 88 jusqu'au codon stop) ainsi que la région 3' non codante du fragment, et,

- un fragment NaeI-EcoRI comprenant une partie de la région codante du facteur d'échange (du nucléotide 196 jusqu'au codon stop) ainsi que la région 3' non codante du fragment,

Il est entendu que la région 3' non codante portée par ces fragments est accessoire et qu'elle peut être éliminée, soit par digestion au moyen d'une nucléase, soit par coupure avec une enzyme ayant un site proche du codon stop, telle que notamment SmaI, dont le site est localisé environ 30 pb après le codon stop.

Il est entendu également que d'autres fragments peuvent être préparés, tels que notamment des fragments ne contenant pas la région codant pour la partie C-terminale entière, ainsi que des dérivés de ces fragments, obtenus par mutation, substitution, addition, ou modification de nature chimique et/ou génétique.

3. Caractérisation biologique

Les fonctionnalités des peptides selon l'invention ont été testées :

- dans des cellules mammifères,
- dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ou encore
- *in vitro* sur la protéine Ha-Ras recombinante.

3.1. Pour l'évaluation fonctionnelle dans les cellules mammifères, les séquences d'ADN codant pour des peptides de l'invention, tels que par exemple ceux décrits dans l'exemple 2, peuvent être placées sous contrôle du promoteur précoce de SV40 dans le vecteur pCym1 décrit par Camonis et al. [Gene 86 (1990) 263].

Dans cet exemple, les fragments PstI-EcoRI et EcoNI-EcoRI décrit dans l'exemple 2 ont été insérés dans ce vecteur.

Les vecteurs ainsi obtenus ont été testés par transfection transitoire dans des cellules CHO selon le protocole décrit par Rey et al. [Oncogene 6 (1991) 347].

Deux critères de fonctionnalité ont ainsi été étudiés :

- la capacité des vecteurs à transactiver un promoteur gouvernant l'expression d'un gène reporteur qui est ici le gène bactérien codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (gène CAT),
- leur capacité à promouvoir la charge en GTP des protéines Ras des cellules CHO transfectées.

a) Pour les tests de transactivation, des cellules CHO à 50 % de confluence ont été transfectées (voir par exemple le protocole décrit par Schweighoffer et al.

Science, In Press) d'une part avec 0,5 µg d'un vecteur portant le gène CAT sous contrôle d'un promoteur synthétique composé du promoteur murin du gène de la thymidine kinase et de 4 éléments PEA1 répétés dérivés de l'enhancer du polyôme [Wasylyk et al., EMBO J. 7 (1988) 2475], et d'autre part avec 4,5 µg d'un vecteur d'expression portant, sous contrôle du promoteur précoce de SV40, aucun ADNc codant (piste 1), l'ADNc de Ha-Ras normal (piste 2), l'ADNc de Ha-Ras activé en 12 (Val 12) (piste 3), l'extrémité 3' du cDNA de SDC25 décrite par Rey et al. précitée (piste 4), et l'ADNc codant pour un peptide selon l'invention décrit ci-dessus (piste 5).

Les résultats sont présentés sur la figure 1. La piste 1 correspondant à l'activation basale, la piste 3 (obtenue pour le fragment PstI-EcoRI : CDC hum.) montre que l'expression d'un peptide de l'invention permet la transactivation du promoteur synthétique utilisé.

Le même résultat qualitatif a été obtenu pour les autres fragments étudiés.

b) De façon à vérifier que cette transactivation implique bien une charge nucléotidique des protéines ras des cellules CHO, les mêmes transfections transitoires ont été réalisées, le milieu de culture étant additionné d'orthophosphate marqué au ³²P.

Ce protocole de marquage ainsi que celui de l'immunoprécipitation des protéines ras cellulaires est décrit par Rey et al. précitée. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2. Ils montrent que les peptides de l'invention sont capables de moduler les niveaux d'échange du GDP sur les protéines ras puisque certains d'entre eux (peptide CDC Hum. exprimé par le fragment PstI-EcoRI décrit ci-avant) sont capables de promouvoir la charge en GTP des protéines ras de cellules CHO immunoprécipitées par l'anticorps Y 13-259.

3.2. Les peptides de l'invention ont également été testés fonctionnellement dans la levure *S.cerevisiae* cdc25⁻. Pour cela, les vecteurs décrits précédemment (3.1.), qui sont des vecteurs navettes, ont été introduits dans la souche de levure OL97-1-11B [Camonis et Jacquet, Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 2980]. Les résultats obtenus montrent que les fragments d'ADNc selon l'invention codent pour des peptides qui sont capables de compléter le défaut de croissance de cette souche à 36°C. Ces résultats montrent ainsi que ces fragments codent pour des peptides fonctionnels in vivo dans *S.cerevisiae*.

3.3. La capacité des séquences d'ADN de l'invention à coder pour des peptides capables de promouvoir l'échange du GDP sur des protéines Ha-Ras purifiées a également été démontrée *in vitro* selon le protocole décrit par Rey et al. Mol. Cell. Biol. 2 (1989) 3904].

5 Pour cela les séquences de l'invention sont exprimées dans la souche d'*E.coli* TG1 sous forme de protéines de fusion avec la glutathion S-transférase (GST) selon la technique décrite par Smith et Johnson [Gene 67 (1988) 31]. Pour cela, les différents fragments d'ADN décrits en 3.1. ci-dessus ont été clonés, sous forme de fragments SmaI-EcoRI, dans le vecteur pGEX 2T (Pharmacia), en 3' et en phase d'un
10 ADNc codant pour la GST. Les fragments SmaI-EcoRI sont obtenus par ajout d'un adaptateur au moyen d'une ligase. Les vecteurs ainsi obtenus sont ensuite utilisés pour transformer la souche *E.coli* TG1. Les cellules ainsi transformées sont précultivées une nuit à 37°C, diluées au 1/10e dans du milieu LB, ajoutées d'IPTG pour induire l'expression (2 heures, 25°C), puis cultivées 21 heures environ à 25°C.
15 Les cellules sont ensuite lysées, et les protéines de fusions produites sont purifiées par affinité sur colonne Agarose-GSH. Pour cela, le lysat bactérien est incubé en présence du gel (préparé et équilibré avec le tampon de lyse) pendant 15 minutes à 4°C. Après 3 lavages avec un tampon Tris-HCl pH 7,4, les protéines sont éluées en présence d'un tampon Tris-HCl pH 7,7 contenant un excès de GSH. Le surnageant est
20 récolté et centrifugé.

L'activité d'échange du GDP des peptides de l'invention sur des protéines Ha-Ras purifiées a ensuite été démontrée *in vitro* selon le protocole décrit par Rey et al. (Mol. Cell. Biol. précitée). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3. Ils montrent notamment que le peptide de l'invention correspondant à la séquence CDC
25 hum exprimée par le fragment PstI-EcoRI décrit ci-avant stimule l'échange du GDP.

4. Mise en évidence de séquences homologues

Des séquences d'acides nucléiques homologues à celle présentée sur la figure 1 ont été mises en évidence par deux stratégies différentes :

- par PCR, dans les conditions décrites dans les techniques générales de
30 clonage, sur des ADNc néosynthétisés à partir d'ARNm de placenta, en utilisant comme amorces des oligonucléotides dégénérés choisis pour recouvrir des séquences conservées entre la séquence SEQ ID n°1 et la séquence de la protéine SOS [Bonfini et al., Science 255 (1992) 603].

- Par criblage d'une banque d'ADNc de placenta à l'aide d'une sonde constituée par la totalité de la séquence SEQ ID n°1 marquée au ³²P. Ce criblage a été réalisé dans des conditions de faible stringence : hybridation à 50°C en milieu 5 x SSC, 5 x Denhart's; puis lavage à 50°C en milieu 2 x SSC.

5 Ces deux stratégies ont permis de révéler des séquences homologues à la séquence SEQ ID n°1. Ces séquences peuvent être aisément isolées et caractérisées. Elles constituent des séquences nucléiques au sens de la présente invention, lorsqu'elles codent (ou leurs fragments ou dérivés) pour des peptides capables de moduler les niveaux d'échanges du GDP sur des complexes p21-GDP.

10 En particulier, cette stratégie a permis l'identification, à partir d'ARNm de placenta et en utilisant les oligonucléotides oligo 2449 (SEQ ID n° 9) et oligo 2451 (SEQ ID n° 10), de 2 ADNc codant pour des facteurs désignés hSOS1 et hSOS2, dont les séquences partielles sont représentées sur les SEQ ID n° 5 et SEQ ID n° 7 respectivement. Les ARNm correspondant à ces facteurs sont présents dans tous les
15 tissus dans lesquels ils ont été recherchés, contrairement au facteur décrit dans l'exemple 1 qui semble localisé uniquement dans le cerveau. La localisation chromosomique de ces gènes a été effectuée et a donné les résultats suivants :

- h-GRF : 15q2.4.
- h-SOS1 : 4q2.1.
- 20 - h-SOS2 : 14q2.2.

5. Recherche de facteurs d'échange de type h-GRF dans d'autres tissus

Un anticorps anti h-GRF a été préparé chez le lapin, par immunisation avec un antigène correspondant au fragment de 280 acides aminés localisé entre les résidus 211 et 489 du facteur h-GRF présenté sur la SEQ ID n° 4.

25 Cet anticorps a permis la détection, par ELISA, dans du cortex humain et des cellules précurseur du cerveau, de protéines de poids moléculaires apparents 30, 55, 75, 95 et 140 kDa. La diversité des poids moléculaires suggère la présence d'ADNc multiples. La préincubation de l'anticorps anti h-GRF avec le h-GRF supprime la détection des protéines identifiées, ce qui démontre la spécificité du
30 signal.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PEPTIDES INHIBANT L'ACTIVITE DES
 PROTEINES RAS, PREPARATION ET UTILISATION

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 10

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 2652 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMENT: 1..2445

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMENT: 445..2445 (SEQ ID NO 3)

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMENT: 976..2445 (SEQ ID NO 4)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

55	GGC GAT GGC TGT AAG ATC CTC CTG GAC ACC AGC CAG ACC TTT GTG AGA	48
	Gly Asp Gly Cys Lys Ile Leu Leu Asp Thr Ser Gln Thr Phe Val Arg	
	1 5 10 15	
60	CAA GGT TCC CTC ATT CAG GTG CCC ATG TCT GAA AAG GGC AAG ATC ACC	96
	Gln Gly Ser Leu Ile Gln Val Pro Met Ser Glu Lys Gly Lys Ile Thr	
	20 25 30	
	AGG GGG CGC CTG GGG TCT CTC TCC CTA AAG AAA GAG GGC GAG CGA CAG	144

	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Gln	
			35					40					45				
5	TGC	TTC	CTG	TTT	TCT	AAG	CAT	CTG	ATT	ATC	TGT	ACC	AGA	GGC	TCT	GGA	192
	Cys	Phe	Leu	Phe	Ser	Lys	His	Leu	Ile	Ile	Cys	Thr	Arg	Gly	Ser	Gly	
		50				55					60						
10	GGG	AAG	CTT	CAC	TTG	ACC	AAG	AAT	GGA	GTC	ATA	TCC	CTC	ATT	GAC	TGC	240
	Gly	Lys	Leu	His	Leu	Thr	Lys	Asn	Gly	Val	Ile	Ser	Leu	Ile	Asp	Cys	
	65				70				75						80		
15	ACT	TTA	TTG	GAG	GAG	CCA	GAA	AGC	ACG	GAG	GAG	GAA	GCC	AAA	GGA	TCC	288
	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Pro	Glu	Ser	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Lys	Gly	Ser	
				85					90					95			
	GGC	CAA	GAC	ATA	GAT	CAC	TTG	GAT	TTT	AAA	ATC	GGG	GTG	GAG	CCA	AAG	336
	Gly	Gln	Asp	Ile	Asp	His	Leu	Asp	Phe	Lys	Ile	Gly	Val	Glu	Pro	Lys	
			100					105				110					
20	GAT	TCC	CCG	CCC	TTT	ACA	GTC	ATC	CTA	GTG	GCC	TCG	TCC	AGA	CAG	GAG	384
	Asp	Ser	Pro	Pro	Phe	Thr	Val	Ile	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Gln	Glu	
			115				120					125					
25	AAG	GCA	GCG	TGG	ACC	AGT	GAC	ATC	AGC	CAG	TGT	GTT	GGT	AAC	ATC	CGA	432
	Lys	Ala	Ala	Trp	Thr	Ser	Asp	Ile	Ser	Gln	Cys	Val	Gly	Asn	Ile	Arg	
		130					135				140						
30	TGC	AAT	GGG	CTC	ATG	ATG	AAG	CCA	TTT	GAA	GAA	AAT	TCC	AAG	GTC	ACT	480
	Cys	Asn	Gly	Leu	Met	Met	Lys	Pro	Phe	Glu	Glu	Asn	Ser	Lys	Val	Thr	
	145				150					155					160		
35	GTG	CCG	CAG	ATG	ATC	AAG	TCC	GAC	GCC	TCC	TTA	TAT	TGT	GAT	GAT	GTT	528
	Val	Pro	Gln	Met	Ile	Lys	Ser	Asp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Cys	Asp	Asp	Val	
				165				170						175			
	GAC	ATT	CGC	TTC	AGC	AAA	ACC	ATG	AAC	TCC	TGC	AAA	GTG	CTG	CAG	ATC	576
	Asp	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Thr	Met	Asn	Ser	Cys	Lys	Val	Leu	Gln	Ile	
			180					185					190				
40	GCC	TAC	GCC	AGT	GTG	GAG	CGG	CTG	CTG	GAG	AGG	CTG	ACG	GAC	CTG	CGC	624
	Ala	Tyr	Ala	Ser	Val	Glu	Arg	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Thr	Asp	Leu	Arg	
			195				200					205					
45	TTC	CTG	AGC	ATC	GAC	TTC	CTC	AAC	ACC	TTC	CTG	CAC	TCC	TAC	CGC	GTC	672
	Phe	Leu	Ser	Ile	Asp	Phe	Leu	Asn	Thr	Phe	Leu	His	Ser	Tyr	Arg	Val	
		210				215					220						
50	TTC	ACC	ACC	GCC	ATC	GTG	GTC	CTG	GAC	AAG	CTC	ATT	ACC	ATC	TAC	AAG	720
	Phe	Thr	Thr	Ala	Ile	Val	Val	Leu	Asp	Lys	Leu	Ile	Thr	Ile	Tyr	Lys	
	225				230			235							240		
55	AAG	CCT	ATC	AGT	GCC	ATT	CCT	GCC	AGG	TCG	CTG	GAG	CTC	CTG	TTT	GCC	768
	Lys	Pro	Ile	Ser	Ala	Ile	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Phe	Ala	
				245				250						255			
	AGT	GGC	CAG	AAC	AAT	AAG	CTC	CTG	TAC	GGT	GAA	CCC	CCC	AAG	TCC	CCG	816
	Ser	Gly	Gln	Asn	Asn	Lys	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	
			260				265							270			
60	CGC	GCC	ACC	CGC	AAG	TTC	TCC	TCG	CCG	CCA	CCT	CTG	TCC	ATC	ACC	AAG	864
	Arg	Ala	Thr	Arg	Lys	Phe	Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	
			275				280						285				

	ACA TCG TCA CCG AGC CGC CGG CGG AAG CTC TCC CTG AAC ATC CCC ATC	912
	Thr Ser Ser Pro Ser Arg Arg Arg Lys Leu Ser Leu Asn Ile Pro Ile	
	290 295 300	
5	ATC ACT GGC GGC AAG GCC CTG GAC CTG GCC GCC CTC AGC TGC AAC TCC	960
	Ile Thr Gly Gly Lys Ala Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ser Cys Asn Ser	
	305 310 315 320	
10	AAT GGC TAC ACC AGC ATG TAC TCG GCC ATG TCA CCC TTC AGC AAG GCC	1008
	Asn Gly Tyr Thr Ser Met Tyr Ser Ala Met Ser Pro Phe Ser Lys Ala	
	325 330 335	
15	ACG CTG GAC ACC AGC AAG CTC TAT GTG TCC AGC AGC TTC ACC AAC AAG	1056
	Thr Leu Asp Thr Ser Lys Leu Tyr Val Ser Ser Ser Phe Thr Asn Lys	
	340 345 350	
20	ATT CCA GAT GAG GGC GAT ACG ACC CCT GAG AAG CCC GAA GAC CCT TCA	1104
	Ile Pro Asp Glu Gly Asp Thr Thr Pro Glu Lys Pro Glu Asp Pro Ser	
	355 360 365	
25	GCG CTC AGC AAG CAG AGC TCA GAA GTC TCC ATG AGA GAG GAG TCA GAT	1152
	Ala Leu Ser Lys Gln Ser Ser Ser Glu Val Ser Met Arg Glu Glu Ser Asp	
	370 375 380	
30	ATT GAT CAA AAC CAG AGT GAT GAT GGT GAT ACT GAA ACA TCA CCA ACT	1200
	Ile Asp Gln Asn Gln Ser Asp Asp Gly Asp Thr Glu Thr Ser Pro Thr	
	385 390 395 400	
35	AAA TCT CCA ACA ACA CCC AAA TCA GTC AAA AAC AAA AAT TCT TCA GAG	1248
	Lys Ser Pro Thr Thr Pro Lys Ser Val Lys Asn Lys Asn Ser Ser Glu	
	405 410 415	
40	TTC CCA CTC TTT TCC TAT AAC AAT GGA GTC GTC ATG ACC TCC TGT CGT	1296
	Phe Pro Leu Phe Ser Tyr Asn Asn Gly Val Val Met Thr Ser Cys Arg	
	420 425 430	
45	GAA CTG GAC AAT AAC CGC AGT GCC TTG TCG GCC GCC TCT GCC TTT GCC	1344
	Glu Leu Asp Asn Asn Arg Ser Ala Leu Ser Ala Ala Ser Ala Phe Ala	
	435 440 445	
50	ATA GCA ACC GCC GGG GCC AAC GAG GGC ACC CCA AAC AAG GAG AAG TAC	1392
	Ile Ala Thr Ala Gly Ala Asn Glu Gly Thr Pro Asn Lys Glu Lys Tyr	
	450 455 460	
55	CGG AGG ATG TCC TTA GCC AGT GCA GGG TTT CCC CCA GAC CAG AGG AAT	1440
	Arg Arg Met Ser Leu Ala Ser Ala Gly Phe Pro Pro Asp Gln Arg Asn	
	465 470 475 480	
60	GGA GAC AAG GAG TTT GTG ATC CGC AGA GCA GCC ACC AAT CGT GTC TTG	1488
	Gly Asp Lys Glu Phe Val Ile Arg Arg Ala Ala Thr Asn Arg Val Leu	
	485 490 495	
65	AAC GTG CTC CGC CAC TGG GTG TCC AAG CAC TCT CAG GAC TTT GAG ACC	1536
	Asn Val Leu Arg His Trp Val Ser Lys His Ser Gln Asp Phe Glu Thr	
	500 505 510	
70	AAC GAT GAG CTC AAA TGC AAG GTG ATC GGC TTC CTG GAA GAA GTC ATG	1584
	Asn Asp Glu Leu Lys Cys Lys Val Ile Gly Phe Leu Glu Glu Val Met	
	515 520 525	
75	CAC GAC CCG GAG CTC CTG ACC CAG GAG CGG AAG GCT GCA GCC AAC ATC	1632
	His Asp Pro Glu Leu Leu Thr Gln Glu Arg Lys Ala Ala Ala Asn Ile	
	530 535 540	

5	ATC AGG ACT CTG ACC CAG GAG GAC CCA GGT GAC AAC CAG ATC ACG CTG Ile Arg Thr Leu Thr Gln Glu Asp Pro Gly Asp Asn Gln Ile Thr Leu 545 550 555 560	1680
10	GAG GAG ATC ACG CAG ATG GCT GAA GGC GTG AAG GCT GAG CCC TTT GAA Glu Glu Ile Thr Gln Met Ala Glu Gly Val Lys Ala Glu Pro Phe Glu 565 570 575	1728
15	AAC CAC TCA GCC CTG GAG ATC GCG GAG CAG CTG ACC CTG CTA GAT CAC Asn His Ser Ala Leu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Thr Leu Leu Asp His 580 585 590	1776
20	CTC GTC TTC AAG AAG ATT CCT TAT GAG GAG TTC TTC GGA CAA GGA TGG Leu Val Phe Lys Lys Ile Pro Tyr Glu Glu Phe Phe Gly Gln Gly Trp 595 600 605	1824
25	ATG AAA CTG GAA AAG AAT GAA AGG ACC CCT TAT ATC ATG AAA ACC ACT Met Lys Leu Glu Lys Asn Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Met Lys Thr Thr 610 615 620	1872
30	AAG CAC TTC AAT GAC ATC AGT AAC TTG ATT GCT TCA GAA ATC ATC CGC Lys His Phe Asn Asp Ile Ser Asn Leu Ile Ala Ser Glu Ile Ile Arg 625 630 635 640	1920
35	AAT GAG GAC ATC AAC GCC AGG GTG AGC GCC ATC GAG AAG TGG GTG GCC Asn Glu Asp Ile Asn Ala Arg Val Ser Ala Ile Glu Lys Trp Val Ala 645 650 655	1968
40	GTA GCT GAC ATA TGC CGC TGC CTC CAC AAC TAC AAT GCC GTA CTG GAG Val Ala Asp Ile Cys Arg Cys Leu His Asn Tyr Asn Ala Val Leu Glu 660 665 670	2016
45	ATC ACC TCG TCC ATG AAC CGC AGT GCA ATC TTC CGG CTC AAA AAG ACG Ile Thr Ser Ser Met Asn Arg Ser Ala Ile Phe Arg Leu Lys Lys Thr 675 680 685	2064
50	TGG CTC AAA GTC TCT AAG CAG ACT AAA GCT TTG ATT GAT AAG CTC CAA Trp Leu Lys Val Ser Lys Gln Thr Lys Ala Leu Ile Asp Lys Leu Gln 690 695 700	2112
55	AAG CTT GTG TCA TCT GAG GGC AGA TTT AAG AAT CTC AGA GAA GCT TTG Lys Leu Val Ser Ser Glu Gly Arg Phe Lys Asn Leu Arg Glu Ala Leu 705 710 715 720	2160
60	AAA AAT TGT GAC CCA CCC TGT GTC CCT TAC CTG GGG ATG TAC CTC ACC Lys Asn Cys Asp Pro Pro Cys Val Pro Tyr Leu Gly Met Tyr Leu Thr 725 730 735	2208
65	GAC CTG GCC TTC ATC GAG GAG GGG ACG CCC AAT TAC ACG GAA GAC GGC Asp Leu Ala Phe Ile Glu Glu Gly Thr Pro Asn Tyr Thr Glu Asp Gly 740 745 750	2256
70	CTG GTC AAC TTC TCC AAG ATG AGG ATG ATA TCC CAT ATT ATC CGA GAG Leu Val Asn Phe Ser Lys Met Arg Met Ile Ser His Ile Ile Arg Glu 755 760 765	2304
75	ATT CGC CAG TTT CAA CAA ACT GCC TAC AAA ATA GAG CAC CAA GCA AAG Ile Arg Gln Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Ile Glu His Gln Ala Lys 770 775 780	2352
80	GTA ACG CAA TAT TTA CTG GAC CAA TCT TTT GTA ATG GAT GAA GAA AGC Val Thr Gln Tyr Leu Leu Asp Gln Ser Phe Val Met Asp Glu Glu Ser 785 790 795	2400

785 790 795 800

CTC TAC GAG TCT TCT CTC CGA ATA GAA CCA AAA CTC CCC ACC TGAAGCTGTG 2452
 Leu Tyr Glu Ser Ser Leu Arg Ile Glu Pro Lys Leu Pro Thr
 805 810 815

5 CCCAGCCCAG ACCCAGCTGC TCCCGGGGAC ATGTGCTAGA TGATACTGTA CATATTCGTT 2512

10 TGGTTTCACT GGATTTTCTT CTTCAGTATG TGCTTCTCCA AGAATACAAA TCGTCCCTGT 2572

TCTTAGATTG CTGTAGAACC GGAATATGAA TTCTGCACC GTTCAGACT TCGCCACCCC 2632

ATCCCTCCCC TCGCCCGAAT 2652

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 814 acides aminé
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Gly Asp Gly Cys Lys Ile Leu Leu Asp Thr Ser Gln Thr Phe Val Arg
 1 5 10 15

30 Gln Gly Ser Leu Ile Gln Val Pro Met Ser Glu Lys Gly Lys Ile Thr
 20 25 30

Arg Gly Arg Leu Gly Ser Leu Ser Leu Lys Lys Glu Gly Glu Arg Gln
 35 40 45

35 Cys Phe Leu Phe Ser Lys His Leu Ile Ile Cys Thr Arg Gly Ser Gly
 50 55 60

40 Gly Lys Leu His Leu Thr Lys Asn Gly Val Ile Ser Leu Ile Asp Cys
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Glu Glu Pro Glu Ser Thr Glu Glu Glu Ala Lys Gly Ser
 85 90 95

45 Gly Gln Asp Ile Asp His Leu Asp Phe Lys Ile Gly Val Glu Pro Lys
 100 105 110

Asp Ser Pro Pro Phe Thr Val Ile Leu Val Ala Ser Ser Arg Gln Glu
 115 120 125

50 Lys Ala Ala Trp Thr Ser Asp Ile Ser Gln Cys Val Gly Asn Ile Arg
 130 135 140

55 Cys Asn Gly Leu Met Met Lys Pro Phe Glu Glu Asn Ser Lys Val Thr
 145 150 155 160

Val Pro Gln Met Ile Lys Ser Asp Ala Ser Leu Tyr Cys Asp Asp Val
 165 170 175

60 Asp Ile Arg Phe Ser Lys Thr Met Asn Ser Cys Lys Val Leu Gln Ile
 180 185 190

Ala Tyr Ala Ser Val Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu Thr Asp Leu Arg

	195	200	205
	Phe Leu Ser Ile Asp Phe	Leu Asn Thr Phe	Leu His Ser Tyr Arg Val
5	210	215	220
	Phe Thr Thr Ala Ile Val	Val Leu Asp Lys	Leu Ile Thr Ile Tyr Lys
	225	230	235 240
10	Lys Pro Ile Ser Ala Ile	Pro Ala Arg Ser	Leu Glu Leu Leu Phe Ala
	245	250	255
	Ser Gly Gln Asn Asn Lys	Leu Leu Tyr Gly	Glu Pro Pro Lys Ser Pro
	260	265	270
15	Arg Ala Thr Arg Lys Phe	Ser Ser Pro Pro	Pro Leu Ser Ile Thr Lys
	275	280	285
	Thr Ser Ser Pro Ser Arg	Arg Arg Lys Leu	Ser Leu Asn Ile Pro Ile
20	290	295	300
	Ile Thr Gly Gly Lys Ala	Leu Asp Leu Ala	Ala Leu Ser Cys Asn Ser
	305	310	315 320
25	Asn Gly Tyr Thr Ser Met	Tyr Ser Ala Met	Ser Pro Phe Ser Lys Ala
	325	330	335
	Thr Leu Asp Thr Ser Lys	Leu Tyr Val Ser	Ser Ser Phe Thr Asn Lys
	340	345	350
30	Ile Pro Asp Glu Gly Asp	Thr Thr Pro Glu	Lys Pro Glu Asp Pro Ser
	355	360	365
	Ala Leu Ser Lys Gln Ser	Ser Ser Glu Val	Ser Met Arg Glu Glu Ser Asp
35	370	375	380
	Ile Asp Gln Asn Gln Ser	Asp Asp Gly Asp	Thr Glu Thr Ser Pro Thr
	385	390	395 400
40	Lys Ser Pro Thr Thr Pro	Lys Ser Val Lys	Asn Lys Asn Ser Ser Glu
	405	410	415
	Phe Pro Leu Phe Ser Tyr	Asn Asn Gly Val	Val Met Thr Ser Cys Arg
	420	425	430
45	Glu Leu Asp Asn Asn Arg	Ser Ala Leu Ser	Ala Ala Ser Ala Phe Ala
	435	440	445
	Ile Ala Thr Ala Gly Ala	Asn Glu Gly Thr	Pro Asn Lys Glu Lys Tyr
50	450	455	460
	Arg Arg Met Ser Leu Ala	Ser Ala Gly Phe	Pro Pro Asp Gln Arg Asn
	465	470	475 480
55	Gly Asp Lys Glu Phe Val	Ile Arg Arg Ala	Ala Ala Thr Asn Arg Val Leu
	485	490	495
	Asn Val Leu Arg His Trp	Val Ser Lys His	Ser Gln Asp Phe Glu Thr
	500	505	510
60	Asn Asp Glu Leu Lys Cys	Lys Val Ile Gly	Phe Leu Glu Glu Val Met
	515	520	525
	His Asp Pro Glu Leu Leu	Thr Gln Glu Arg	Lys Ala Ala Ala Asn Ile

	530		535		540
	Ile Arg Thr Leu Thr Gln Glu Asp Pro Gly Asp Asn Gln Ile Thr Leu				
5	545		550		555 560
	Glu Glu Ile Thr Gln Met Ala Glu Gly Val Lys Ala Glu Pro Phe Glu				
			565		570 575
10	Asn His Ser Ala Leu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Thr Leu Leu Asp His				
			580		585 590
	Leu Val Phe Lys Lys Ile Pro Tyr Glu Glu Phe Phe Gly Gln Gly Trp				
			595		600 605
15	Met Lys Leu Glu Lys Asn Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Met Lys Thr Thr				
			610		615 620
	Lys His Phe Asn Asp Ile Ser Asn Leu Ile Ala Ser Glu Ile Ile Arg				
20			625		630 635 640
	Asn Glu Asp Ile Asn Ala Arg Val Ser Ala Ile Glu Lys Trp Val Ala				
			645		650 655
25	Val Ala Asp Ile Cys Arg Cys Leu His Asn Tyr Asn Ala Val Leu Glu				
			660		665 670
	Ile Thr Ser Ser Met Asn Arg Ser Ala Ile Phe Arg Leu Lys Lys Thr				
			675		680 685
30	Trp Leu Lys Val Ser Lys Gln Thr Lys Ala Leu Ile Asp Lys Leu Gln				
			690		695 700
	Lys Leu Val Ser Ser Glu Gly Arg Phe Lys Asn Leu Arg Glu Ala Leu				
35			705		710 715 720
	Lys Asn Cys Asp Pro Pro Cys Val Pro Tyr Leu Gly Met Tyr Leu Thr				
			725		730 735
40	Asp Leu Ala Phe Ile Glu Glu Gly Thr Pro Asn Tyr Thr Glu Asp Gly				
			740		745 750
	Leu Val Asn Phe Ser Lys Met Arg Met Ile Ser His Ile Ile Arg Glu				
			755		760 765
45	Ile Arg Gln Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Ile Glu His Gln Ala Lys				
			770		775 780
	Val Thr Gln Tyr Leu Leu Asp Gln Ser Phe Val Met Asp Glu Glu Ser				
50			785		790 795 800
	Leu Tyr Glu Ser Ser Leu Arg Ile Glu Pro Lys Leu Pro Thr				
			805		810

55 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 666 acides aminé

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Met Lys Pro Phe Glu Glu Asn Ser Lys Val Thr Val Pro Gln Met
 1 5 10 15
 5 Ile Lys Ser Asp Ala Ser Leu Tyr Cys Asp Asp Val Asp Ile Arg Phe
 20 25 30
 10 Ser Lys Thr Met Asn Ser Cys Lys Val Leu Gln Ile Ala Tyr Ala Ser
 35 40 45
 Val Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu Thr Asp Leu Arg Phe Leu Ser Ile
 50 55 60
 15 Asp Phe Leu Asn Thr Phe Leu His Ser Tyr Arg Val Phe Thr Thr Ala
 65 70 75 80
 Ile Val Val Leu Asp Lys Leu Ile Thr Ile Tyr Lys Lys Pro Ile Ser
 85 90 95
 20 Ala Ile Pro Ala Arg Ser Leu Glu Leu Leu Phe Ala Ser Gly Gln Asn
 100 105 110
 25 Asn Lys Leu Leu Tyr Gly Glu Pro Pro Lys Ser Pro Arg Ala Thr Arg
 115 120 125
 Lys Phe Ser Ser Pro Pro Pro Leu Ser Ile Thr Lys Thr Ser Ser Pro
 130 135 140
 30 Ser Arg Arg Arg Lys Leu Ser Leu Asn Ile Pro Ile Ile Thr Gly Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ser Cys Asn Ser Asn Gly Tyr Thr
 165 170 175
 35 Ser Met Tyr Ser Ala Met Ser Pro Phe Ser Lys Ala Thr Leu Asp Thr
 180 185 190
 40 Ser Lys Leu Tyr Val Ser Ser Ser Phe Thr Asn Lys Ile Pro Asp Glu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Thr Pro Glu Lys Pro Glu Asp Pro Ser Ala Leu Ser Lys
 210 215 220
 45 Gln Ser Ser Glu Val Ser Met Arg Glu Glu Ser Asp Ile Asp Gln Asn
 225 230 235 240
 Gln Ser Asp Asp Gly Asp Thr Glu Thr Ser Pro Thr Lys Ser Pro Thr
 245 250 255
 50 Thr Pro Lys Ser Val Lys Asn Lys Asn Ser Ser Glu Phe Pro Leu Phe
 260 265 270
 55 Ser Tyr Asn Asn Gly Val Val Met Thr Ser Cys Arg Glu Leu Asp Asn
 275 280 285
 Asn Arg Ser Ala Leu Ser Ala Ala Ser Ala Phe Ala Ile Ala Thr Ala
 290 295 300
 60 Gly Ala Asn Glu Gly Thr Pro Asn Lys Glu Lys Tyr Arg Arg Met Ser
 305 310 315 320
 Leu Ala Ser Ala Gly Phe Pro Pro Asp Gln Arg Asn Gly Asp Lys Glu

	325	330	335
	Phe Val Ile Arg Arg Ala Ala Thr Asn Arg Val Leu Asn Val Leu Arg		
5	340	345	350
	His Trp Val Ser Lys His Ser Gln Asp Phe Glu Thr Asn Asp Glu Leu		
	355	360	365
10	Lys Cys Lys Val Ile Gly Phe Leu Glu Glu Val Met His Asp Pro Glu		
	370	375	380
	Leu Leu Thr Gln Glu Arg Lys Ala Ala Ala Asn Ile Ile Arg Thr Leu		
	385	390	395
15	Thr Gln Glu Asp Pro Gly Asp Asn Gln Ile Thr Leu Glu Glu Ile Thr		
	405	410	415
	Gln Met Ala Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Phe Glu Asn His Ser Ala		
20	420	425	430
	Leu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Thr Leu Leu Asp His Leu Val Phe Lys		
	435	440	445
25	Lys Ile Pro Tyr Glu Glu Phe Phe Gly Gln Gly Trp Met Lys Leu Glu		
	450	455	460
	Lys Asn Gln Arg Thr Pro Tyr Ile Met Lys Thr Thr Lys His Phe Asn		
	465	470	475
30	Asp Ile Ser Asn Leu Ile Ala Ser Glu Ile Ile Arg Asn Glu Asp Ile		
	485	490	495
	Asn Ala Arg Val Ser Ala Ile Glu Lys Trp Val Ala Val Ala Asp Ile		
35	500	505	510
	Cys Arg Cys Leu His Asn Tyr Asn Ala Val Leu Glu Ile Thr Ser Ser		
	515	520	525
40	Met Asn Arg Ser Ala Ile Phe Arg Leu Lys Lys Thr Trp Leu Lys Val		
	530	535	540
	Ser Lys Gln Thr Lys Ala Leu Ile Asp Lys Leu Gln Lys Leu Val Ser		
	545	550	555
45	Ser Glu Gly Arg Phe Lys Asn Leu Arg Glu Ala Leu Lys Asn Cys Asp		
	565	570	575
	Pro Pro Cys Val Pro Tyr Leu Gly Met Tyr Leu Thr Asp Leu Ala Phe		
50	580	585	590
	Ile Glu Glu Gly Thr Pro Asn Tyr Thr Glu Asp Gly Leu Val Asn Phe		
	595	600	605
55	Ser Lys Met Arg Met Ile Ser His Ile Ile Arg Glu Ile Arg Gln Phe		
	610	615	620
	Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Ile Glu His Gln Ala Lys Val Thr Gln Tyr		
	625	630	635
60	Leu Leu Asp Gln Ser Phe Val Met Asp Glu Glu Ser Leu Tyr Glu Ser		
	645	650	655
	Ser Leu Arg Ile Glu Pro Lys Leu Pro Thr		

25

660

665

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 489 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

15 Met Tyr Ser Ala Met Ser Pro Phe Ser Lys Ala Thr Leu Asp Thr Ser
 1 5 10 15
 Lys Leu Tyr Val Ser Ser Ser Phe Thr Asn Lys Ile Pro Asp Glu Gly
 20 25 30
 20 Asp Thr Thr Pro Glu Lys Pro Glu Asp Pro Ser Ala Leu Ser Lys Gln
 35 40 45
 25 Ser Ser Glu Val Ser Met Arg Glu Glu Ser Asp Ile Asp Gln Asn Gln
 50 55 60
 Ser Asp Asp Gly Asp Thr Glu Thr Ser Pro Thr Lys Ser Pro Thr Thr
 65 70 75 80
 30 Pro Lys Ser Val Lys Asn Lys Asn Ser Ser Glu Phe Pro Leu Phe Ser
 85 90 95
 Tyr Asn Asn Gly Val Val Met Thr Ser Cys Arg Glu Leu Asp Asn Asn
 100 105 110
 35 Arg Ser Ala Leu Ser Ala Ala Ser Ala Phe Ala Ile Ala Thr Ala Gly
 115 120 125
 40 Ala Asn Glu Gly Thr Pro Asn Lys Glu Lys Tyr Arg Arg Met Ser Leu
 130 135 140
 Ala Ser Ala Gly Phe Pro Pro Asp Gln Arg Asn Gly Asp Lys Glu Phe
 145 150 155 160
 45 Val Ile Arg Arg Ala Ala Thr Asn Arg Val Leu Asn Val Leu Arg His
 165 170 175
 Trp Val Ser Lys His Ser Gln Asp Phe Glu Thr Asn Asp Glu Leu Lys
 180 185 190
 50 Cys Lys Val Ile Gly Phe Leu Glu Glu Val Met His Asp Pro Glu Leu
 195 200 205
 55 Leu Thr Gln Glu Arg Lys Ala Ala Ala Asn Ile Ile Arg Thr Leu Thr
 210 215 220
 Gln Glu Asp Pro Gly Asp Asn Gln Ile Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gln
 225 230 235 240
 60 Met Ala Glu Gly Val Lys Ala Glu Pro Phe Glu Asn His Ser Ala Leu
 245 250 255
 Glu Ile Ala Glu Gln Leu Thr Leu Leu Asp His Leu Val Phe Lys Lys

26

	260	265	270
	Ile Pro Tyr Glu Glu Phe Phe Gly Gln Gly Trp Met Lys Leu Glu Lys		
	275	280	285
5	Asn Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Met Lys Thr Thr Lys His Phe Asn Asp		
	290	295	300
10	Ile Ser Asn Leu Ile Ala Ser Glu Ile Ile Arg Asn Glu Asp Ile Asn		
	305	310	315
	Ala Arg Val Ser Ala Ile Glu Lys Trp Val Ala Val Ala Asp Ile Cys		
	325	330	335
15	Arg Cys Leu His Asn Tyr Asn Ala Val Leu Glu Ile Thr Ser Ser Met		
	340	345	350
	Asn Arg Ser Ala Ile Phe Arg Leu Lys Lys Thr Trp Leu Lys Val Ser		
	355	360	365
20	Lys Gln Thr Lys Ala Leu Ile Asp Lys Leu Gln Lys Leu Val Ser Ser		
	370	375	380
	Glu Gly Arg Phe Lys Asn Leu Arg Glu Ala Leu Lys Asn Cys Asp Pro		
	385	390	395
25	Pro Cys Val Pro Tyr Leu Gly Met Tyr Leu Thr Asp Leu Ala Phe Ile		
	405	410	415
30	Glu Glu Gly Thr Pro Asn Tyr Thr Glu Asp Gly Leu Val Asn Phe Ser		
	420	425	430
	Lys Met Arg Met Ile Ser His Ile Ile Arg Glu Ile Arg Gln Phe Gln		
	435	440	445
35	Gln Thr Ala Tyr Lys Ile Glu His Gln Ala Lys Val Thr Gln Tyr Leu		
	450	455	460
	Leu Asp Gln Ser Phe Val Met Asp Glu Glu Ser Leu Tyr Glu Ser Ser		
	465	470	475
40	Leu Arg Ile Glu Pro Lys Leu Pro Thr		
	485		

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1092 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

50

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

60

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..1092

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

5	ATT ACT AAA ATA ATC CAA AGG AAA AAA ATT GCA AGA GAC AAT GGA CCA Ile Thr Lys Ile Ile Gln Arg Lys Lys Ile Ala Arg Asp Asn Gly Pro	48
	1 5 10 15	
10	GGT CAT AAT ATT ACA TTT CAG AGT TCA CCT CCC ACA GTT GAG TGG CAT Gly His Asn Ile Thr Phe Gln Ser Ser Pro Pro Thr Val Glu Trp His	96
	20 25 30	
15	ATA AGC AGA CCT GGG CAC ATA GAG ACT TTT GAC CTG CTC ACC TTA CAC Ile Ser Arg Pro Gly His Ile Glu Thr Phe Asp Leu Leu Thr Leu His	144
	35 40 45	
20	CCA ATA GAA ATT GCT CGA CAA CTC ACT TTA CTT GAT TCA GAT CTA TAC Pro Ile Glu Ile Ala Arg Gln Leu Thr Leu Leu Asp Ser Asp Leu Tyr	192
	50 55 60	
25	CGA GCT GTA CAG CCA TCA GAT TTA GTT GGA AGT GTG TGG ACA AAA GAA Arg Ala Val Gln Pro Ser Asp Leu Val Gly Ser Val Trp Thr Lys Glu	240
	65 70 75 80	
30	GAC AAA GAA ATT AAC TCT CCT AAT CTT CTG AAA ATG ATT CGA CAT ACC Asp Lys Glu Ile Asn Ser Pro Asn Leu Leu Lys Met Ile Arg His Thr	288
	85 90 95	
35	ACC AAC CTC ACT CTG TGG TTT GAG AAA TGT ATT GTA GAA ACT GAA AAT Thr Asn Leu Thr Leu Trp Phe Glu Lys Cys Ile Val Glu Thr Glu Asn	336
	100 105 110	
40	TTA GAA GAA AGA GTA GCT GTG GTG AGT CGA ATT ATT GAG ATT CTA CAA Leu Glu Glu Arg Val Ala Val Val Ser Arg Ile Ile Glu Ile Leu Gln	384
	115 120 125	
45	GTC TTT CAA GAG TTG AAC AAC TTT AAT GGG GTC CTT GAG GTT GTC AGT Val Phe Gln Glu Leu Asn Asn Phe Asn Gly Val Leu Glu Val Val Ser	432
	130 135 140	
50	GCT ATG AAT TCC TCA CCT GTT TAC AGA CTA GAC CAC ACA TTT GAG CAA Ala Met Asn Ser Ser Pro Val Tyr Arg Leu Asp His Thr Phe Glu Gln	480
	145 150 155 160	
55	ATA CCA AGT CGC CAG AAG AAA ATT TTA GAA GAA GCT CAT GAA TTG AGT Ile Pro Ser Arg Gln Lys Lys Ile Leu Glu Glu Ala His Glu Leu Ser	528
	165 170 175	
60	GAA GAT CAC TAT AAG AAA TAT TTG GCA AAA CTC AGG TCT ATT AAT CCA Glu Asp His Tyr Lys Lys Tyr Leu Ala Lys Leu Arg Ser Ile Asn Pro	576
	180 185 190	
65	CCA TGT GTG CCT TTC TTT GGA ATT TAT CTA CAT AAT ATC TTG AAA ACA Pro Cys Val Pro Phe Phe Gly Ile Tyr Leu His Asn Ile Leu Lys Thr	624
	195 200 205	
70	GAA GAA GGC AAC CCT GAG GTC CTA AAA AGA CAT GGA AAA GAG CTT ATA Glu Glu Gly Asn Pro Glu Val Leu Lys Arg His Gly Lys Glu Leu Ile	672
	210 215 220	
75	AAC TTT AGC AAA AGG AGG AAA GTA GCA GAA ATA ACA GGA GAG ATC CAG Asn Phe Ser Lys Arg Arg Lys Val Ala Glu Ile Thr Gly Glu Ile Gln	720
	225 230 235 240	

28

5	CAG TAC CAA AAT CAG CCT TAC TGT TTA CGA GTA GAA TCA GAT ATC AAA Gln Tyr Gln Asn Gln Pro Tyr Cys Leu Arg Val Glu Ser Asp Ile Lys 245 250 255	768
10	AGG TTC TTT GAA AAC TTG AAT CCG ATG GGA AAT AGC ATG GAG AGG GAA Arg Phe Phe Glu Asn Leu Asn Pro Met Gly Asn Ser Met Glu Arg Glu 260 265 270	816
15	TTT ACA GAT TAT CTT TTC AAC AAA TCC CTA GAA ATA GAA CCA CGA AAC Phe Thr Asp Tyr Leu Phe Asn Lys Ser Leu Glu Ile Glu Pro Arg Asn 275 280 285	864
20	CCT AAG CCT CTC CCA AGA TTT CCA AAA AAA TAT ACG TAT CCC CTA AAA Pro Lys Pro Leu Pro Arg Phe Pro Lys Lys Tyr Thr Tyr Pro Leu Lys 290 295 300	912
25	TCT CCT GGT GTC CGG CCA TCA AAC CCA AGA CCG GGT ACC ATG AGG ATC Ser Pro Gly Val Arg Pro Ser Asn Pro Arg Pro Gly Thr Met Arg Ile 305 310 315 320	960
30	CCC ACC CCT CTA CAG CAG GAA CCA CGA AAA ATA AGT TAT AGT AGA ATA Pro Thr Pro Leu Gln Gln Glu Pro Arg Lys Ile Ser Tyr Ser Arg Ile 325 330 335	1008
35	CCA GAG TCA GAG ACA GAG AGT ACT GCT AGT GCA CCT AAT TCA CCA AGG Pro Glu Ser Glu Thr Glu Ser Thr Ala Ser Ala Pro Asn Ser Pro Arg 340 345 350	1056
40	ACA CCT CTA ACA CCT CCA CCT GCA TCA GGA ACA TCA Thr Pro Leu Thr Pro Pro Pro Ala Ser Gly Thr Ser 355 360	1092
45	(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:	
50	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:	
	(A) LONGUEUR: 364 acides aminés	
	(B) TYPE: acide aminé	
	(D) CONFIGURATION: linéaire	
55	(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine	
60	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:	
	Ile Thr Lys Ile Ile Gln Arg Lys Lys Ile Ala Arg Asp Asn Gly Pro 1 5 10 15	
	Gly His Asn Ile Thr Phe Gln Ser Ser Pro Pro Thr Val Glu Trp His 20 25 30	
	Ile Ser Arg Pro Gly His Ile Glu Thr Phe Asp Leu Leu Thr Leu His 35 40 45	
	Pro Ile Glu Ile Ala Arg Gln Leu Thr Leu Leu Asp Ser Asp Leu Tyr 50 55 60	
	Arg Ala Val Gln Pro Ser Asp Leu Val Gly Ser Val Trp Thr Lys Glu 65 70 75 80	
	Asp Lys Glu Ile Asn Ser Pro Asn Leu Leu Lys Met Ile Arg His Thr 85 90 95	

Thr Asn Leu Thr Leu Trp Phe Glu Lys Cys Ile Val Glu Thr Glu Asn
 100 105 110
 5 Leu Glu Glu Arg Val Ala Val Val Ser Arg Ile Ile Glu Ile Leu Gln
 115 120 125
 Val Phe Gln Glu Leu Asn Asn Phe Asn Gly Val Leu Glu Val Val Ser
 130 135 140
 10 Ala Met Asn Ser Ser Pro Val Tyr Arg Leu Asp His Thr Phe Glu Gln
 145 150 155 160
 Ile Pro Ser Arg Gln Lys Lys Ile Leu Glu Glu Ala His Glu Leu Ser
 165 170 175
 15 Glu Asp His Tyr Lys Lys Tyr Leu Ala Lys Leu Arg Ser Ile Asn Pro
 180 185 190
 20 Pro Cys Val Pro Phe Phe Gly Ile Tyr Leu His Asn Ile Leu Lys Thr
 195 200 205
 Glu Glu Gly Asn Pro Glu Val Leu Lys Arg His Gly Lys Glu Leu Ile
 210 215 220
 25 Asn Phe Ser Lys Arg Arg Lys Val Ala Glu Ile Thr Gly Glu Ile Gln
 225 230 235 240
 Gln Tyr Gln Asn Gln Pro Tyr Cys Leu Arg Val Glu Ser Asp Ile Lys
 245 250 255
 30 Arg Phe Phe Glu Asn Leu Asn Pro Met Gly Asn Ser Met Glu Arg Glu
 260 265 270
 Phe Thr Asp Tyr Leu Phe Asn Lys Ser Leu Glu Ile Glu Pro Arg Asn
 275 280 285
 Pro Lys Pro Leu Pro Arg Phe Pro Lys Lys Tyr Thr Tyr Pro Leu Lys
 290 295 300
 40 Ser Pro Gly Val Arg Pro Ser Asn Pro Arg Pro Gly Thr Met Arg Ile
 305 310 315 320
 Pro Thr Pro Leu Gln Gln Glu Pro Arg Lys Ile Ser Tyr Ser Arg Ile
 325 330 335
 45 Pro Glu Ser Glu Thr Glu Ser Thr Ala Ser Ala Pro Asn Ser Pro Arg
 340 345 350
 50 Thr Pro Leu Thr Pro Pro Pro Ala Ser Gly Thr Ser
 355 360

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- 55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1956 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 60 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..1956

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

5	AGG TTT GAA ATC CCA GAG CCA GAA CCT ACA GAA GCA GAT AAA CTA GCA	48
	Arg Phe Glu Ile Pro Glu Pro Glu Pro Thr Glu Ala Asp Lys Leu Ala	
	1 5 10 15	
15	CTT GAG AAA GGA GAA CAA CCA ATC TCT GCA GAT CTA AAG AGG TTC AGA	96
	Leu Glu Lys Gly Glu Gln Pro Ile Ser Ala Asp Leu Lys Arg Phe Arg	
	20 25 30	
20	AAG GAA TAT ATC CAA CCA GTA CAG CTA CGG GTG TTG AAC GTG CAG CGG	144
	Lys Glu Tyr Ile Gln Pro Val Gln Leu Arg Val Leu Asn Val Gln Arg	
	35 40 45	
25	CAC TGG GTT GAA CAT CAC CCC CAT GAC TTT GAA AGA GAC TTG GAA CTG	192
	His Trp Val Glu His His Pro His Asp Phe Glu Arg Asp Leu Glu Leu	
	50 55 60	
30	CTC GAA AGA CTA GAA TCC TTC ACC TCA AGC GCT CAC AGA GCG AAA GCA	240
	Leu Glu Arg Leu Glu Ser Phe Thr Ser Ser Ala His Arg Ala Lys Ala	
	65 70 75 80	
35	ATG AAG AAG TGG GTA GAG AGC ATC GCT AAG ACC ATC AGG AGG AAG AAG	288
	Met Lys Lys Trp Val Glu Ser Ile Ala Lys Thr Ile Arg Arg Lys Lys	
	85 90 95	
40	CAA GCT CAG GCA AAT GGA GTA AGC CAT AAT ATT ACC TTT GAA AGT CCA	336
	Gln Ala Gln Ala Asn Gly Val Ser His Asn Ile Thr Phe Glu Ser Pro	
	100 105 110	
45	CCT CCA CCA ATT GAA TGG CAT ATC AGC AAA CCA GGA CAG TTT GAA ACA	384
	Pro Pro Pro Ile Glu Trp His Ile Ser Lys Pro Gly Gln Phe Glu Thr	
	115 120 125	
50	TTT GAT CTC ATG ACA CTT CAT CCA ATA GAA ATT GCA CGT CAG CTG ACA	432
	Phe Asp Leu Met Thr Leu His Pro Ile Glu Ile Ala Arg Gln Leu Thr	
	130 135 140	
55	CTT TTG GAG TCT GAT CTT TAC AGG AAA GTT CAA CCG TCT GAA CTT GTA	480
	Leu Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Arg Lys Val Gln Pro Ser Glu Leu Val	
	145 150 155 160	
60	GGG AGT GTG TGG ACC AAA GAA GAT AAA GAA ATA AAT TCT CCA AAT TTA	528
	Gly Ser Val Trp Thr Lys Glu Asp Lys Glu Ile Asn Ser Pro Asn Leu	
	165 170 175	
65	TTA AAA ATG ATT CGC CAT ACC ACA AAT CTC ACC CTC TGG TTT GAA AAA	576
	Leu Lys Met Ile Arg His Thr Thr Asn Leu Thr Leu Trp Phe Glu Lys	
	180 185 190	
70	TGC ATT GTG GAA GCA GAA AAT TTT GAA GAA CGG GTG GCA GTA CTA AGT	624
	Cys Ile Val Glu Ala Glu Asn Phe Glu Glu Arg Val Ala Val Leu Ser	
	195 200 205	
75	AGA ATT ATA GAA ATT CTG CAA GTT TTT CGA GAT TTG AAT AAT TTC AAT	672

	Arg	Ile	Ile	Glu	Ile	Leu	Gln	Val	Phe	Arg	Asp	Leu	Asn	Asn	Phe	Asn	
	210						215					220					
5	GGC	GTA	TTG	GAG	ATA	GTC	AGT	GCA	GTA	AAT	TCA	GTG	TCA	GTA	TAC	AGA	720
	Gly	Val	Leu	Glu	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Asn	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Arg	
	225					230				235						240	
10	CTA	GAC	CAT	ACC	TTT	GAG	GCA	CTG	CAG	GAA	AGG	AAA	AGG	AAA	ATT	TTG	768
	Leu	Asp	His	Thr	Phe	Glu	Ala	Leu	Gln	Glu	Arg	Lys	Arg	Lys	Ile	Leu	
					245					250					255		
15	GAC	GAA	GCT	GTG	GAA	TTA	AGT	CAA	GAT	CAC	TTT	AAA	AAA	TAC	CTA	GTA	816
	Asp	Glu	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Gln	Asp	His	Phe	Lys	Lys	Tyr	Leu	Val	
				260					265					270			
20	AAA	CTT	AAG	TCA	ATC	AAT	CCA	CCT	TGT	GTG	CCT	TTT	TTT	GGA	ATA	TAT	864
	Lys	Leu	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Pro	Cys	Val	Pro	Phe	Phe	Gly	Ile	Tyr	
			275					280					285				
25	TTA	ACA	AAT	ATT	CTG	AAG	ACC	GAA	GAA	GGG	AAT	AAT	GAT	TTT	TTA	AAA	912
	Leu	Thr	Asn	Ile	Leu	Lys	Thr	Glu	Glu	Gly	Asn	Asn	Asp	Phe	Leu	Lys	
		290					295					300					
30	AAG	AAA	GGG	AAA	GAT	TTA	ATC	AAT	TTC	AGT	AAG	AGG	AGG	AAA	GTA	GCT	960
	Lys	Lys	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Asn	Phe	Ser	Lys	Arg	Arg	Lys	Val	Ala	
	305					310				315					320		
35	GAA	ATT	ACT	GGA	GAA	ATT	CAG	CAG	TAT	CAG	AAT	CAG	CCG	TAC	TGC	CTA	1008
	Glu	Ile	Thr	Gly	Glu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Gln	Asn	Gln	Pro	Tyr	Cys	Leu	
				325						330					335		
40	CGG	ATA	GAA	CCA	GAT	ATG	AGG	AGA	TTC	TTT	GAA	AAC	CTT	AAC	CCC	ATG	1056
	Arg	Ile	Glu	Pro	Asp	Met	Arg	Arg	Phe	Phe	Glu	Asn	Leu	Asn	Pro	Met	
				340					345					350			
45	GGA	AGT	GCA	TGT	GAA	AAA	GAG	TTT	ACA	GAT	TAT	TTG	TTT	AAC	AAA	AGT	1104
	Gly	Ser	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Phe	Thr	Asp	Tyr	Leu	Phe	Asn	Lys	Ser	
			355				360					365					
50	TTA	GAA	ATA	GAA	CCA	CGA	AAT	TGT	AAA	CAG	CCA	CCA	CGA	TTT	CCA	CGA	1152
	Leu	Glu	Ile	Glu	Pro	Arg	Asn	Cys	Lys	Gln	Pro	Pro	Arg	Phe	Pro	Arg	
		370					375					380					
55	AAA	AGT	ACA	TTT	GAA	CTA	AAA	GAA	CCA	GGA	ATA	CGA	CCA	AAT	GCA	GGA	1200
	Lys	Ser	Thr	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Pro	Gly	Ile	Arg	Pro	Asn	Ala	Gly	
	385					390				395					400		
60	CGA	CAT	GGA	GAA	ACA	AGT	GGA	ACA	AGA	GGA	CAT	CCA	ACA	CCT	CTA	GAA	1248
	Arg	His	Gly	Glu	Thr	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	His	Pro	Thr	Pro	Leu	Glu	
				405						410					415		
65	AGA	GAA	CCA	TAT	AAA	ATA	GAA	TTT	GAA	AGA	ATA	GCT	GAA	ACA	GAA	CTA	1296
	Arg	Glu	Pro	Tyr	Lys	Ile	Glu	Phe	Glu	Arg	Ile	Ala	Glu	Thr	Glu	Leu	
				420					425				430				
70	GAA	AGT	ACA	GTA	AGT	GCA	CCA	ACA	AGT	CCA	AAT	ACT	CCC	TCA	ACA	CCA	1344
	Glu	Ser	Thr	Val	Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	
			435				440						445				
75	CCA	GTT	TCA	GCA	TCA	TCA	GAT	CAC	TCA	GTA	TTT	TTA	GAT	GTA	GAT	CTA	1392
	Pro	Val	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	His	Ser	Val	Phe	Leu	Asp	Val	Asp	Leu	
		450					455					460					

	AAC AGT AGT CAC GGA TCA AAC ACA ATC TTT GCA CCT GTG CTA CTA CCA	1440
	Asn Ser Ser His Gly Ser Asn Thr Ile Phe Ala Pro Val Leu Leu Pro	
	465 470 475 480	
5	AAG TCC AAG TCT TTC TTT AGT TCA TGT GGA AGT TTA CAT AAA CTA AGT	1488
	Lys Ser Lys Ser Phe Phe Ser Ser Cys Gly Ser Leu His Lys Leu Ser	
	485 490 495	
10	GAA GAG CCC CTG ATT CCT CCT CCT CTT CCT CCT CGA AAA AAG TTT GAT	1536
	Glu Glu Pro Leu Ile Pro Pro Pro Leu Pro Pro Arg Lys Lys Phe Asp	
	500 505 510	
15	CAT GAT GGC TCA AAT TCC AAG GGA AAT ATG AAA TCT GAT GAT GAT CCT	1584
	His Asp Gly Ser Asn Ser Lys Gly Asn Met Lys Ser Asp Asp Asp Pro	
	515 520 525	
20	CCT GCT ATT CCA CCG AGA CAG CCT CCT CCT CCA AAG GTA AAA CCC AGA	1632
	Pro Ala Ile Pro Pro Arg Gln Pro Pro Pro Pro Lys Val Lys Pro Arg	
	530 535 540	
25	GTT CCT GTT CCT ACT GGT GCA TTT GAT GGG CCT CTG CAT AGT CCA CCT	1680
	Val Pro Val Pro Thr Gly Ala Phe Asp Gly Pro Leu His Ser Pro Pro	
	545 550 555 560	
30	CCG CCA CCA CCA AGA GAT CCT CTT CCT GAT ACC CCT CCA CCA GTT CCC	1728
	Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Pro Asp Thr Pro Pro Pro Val Pro	
	565 570 575	
35	CTT CGG CCT CCA GAA CAC TTT ATA AAC TGT CCA TTT AAT CTT CAG CCA	1776
	Leu Arg Pro Pro Glu His Phe Ile Asn Cys Pro Phe Asn Leu Gln Pro	
	580 585 590	
40	CCT CCA CTG GGG CAT CTT CAC AGA GAT TCA GAC TGG CTC AGA GAC ATT	1824
	Pro Pro Leu Gly His Leu His Arg Asp Ser Asp Trp Leu Arg Asp Ile	
	595 600 605	
45	AGT ACG TGT CCA AAT TCG CCA AGC ACT CCT CCT AGC ACA CCC TCT CCA	1872
	Ser Thr Cys Pro Asn Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ser Thr Pro Ser Pro	
	610 615 620	
50	AGG GTA CCG CGT CGA TGC TAT GTG CTC AGT TCT AGT CAG AAT AAT CTT	1920
	Arg Val Pro Arg Arg Cys Tyr Val Leu Ser Ser Ser Gln Asn Asn Leu	
	625 630 635 640	
55	GCT CAT CCT CCA GCT CCC CCT GTT CCA CCA AGG GAG	1956
	Ala His Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Pro Arg Glu	
	645 650	

50 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 652 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

60

Arg Phe Glu Ile Pro Glu Pro Glu Pro Thr Glu Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Leu Glu Lys Gly Glu Gln Pro Ile Ser Ala Asp Leu Lys Arg Phe Arg
 20 25 30
 5 Lys. Glu Tyr Ile Gln Pro Val Gln Leu Arg Val Leu Asn Val Gln Arg
 35 40 45
 His Trp Val Glu His His Pro His Asp Phe Glu Arg Asp Leu Glu Leu
 50 55 60
 10 Leu Glu Arg Leu Glu Ser Phe Thr Ser Ser Ala His Arg Ala Lys Ala
 65 70 75 80
 Met Lys Lys Trp Val Glu Ser Ile Ala Lys Thr Ile Arg Arg Lys Lys
 85 90 95
 15 Gln Ala Gln Ala Asn Gly Val Ser His Asn Ile Thr Phe Glu Ser Pro
 100 105 110
 20 Pro Pro Pro Ile Glu Trp His Ile Ser Lys Pro Gly Gln Phe Glu Thr
 115 120 125
 Phe Asp Leu Met Thr Leu His Pro Ile Glu Ile Ala Arg Gln Leu Thr
 130 135 140
 25 Leu Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Arg Lys Val Gln Pro Ser Glu Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Val Trp Thr Lys Glu Asp Lys Glu Ile Asn Ser Pro Asn Leu
 165 170 175
 30 Leu Lys Met Ile Arg His Thr Thr Asn Leu Thr Leu Trp Phe Glu Lys
 180 185 190
 35 Cys Ile Val Glu Ala Glu Asn Phe Glu Glu Arg Val Ala Val Leu Ser
 195 200 205
 Arg Ile Ile Glu Ile Leu Gln Val Phe Arg Asp Leu Asn Asn Phe Asn
 210 215 220
 40 Gly Val Leu Glu Ile Val Ser Ala Val Asn Ser Val Ser Val Tyr Arg
 225 230 235 240
 Leu Asp His Thr Phe Glu Ala Leu Gln Glu Arg Lys Arg Lys Ile Leu
 245 250 255
 45 Asp Glu Ala Val Glu Leu Ser Gln Asp His Phe Lys Lys Tyr Leu Val
 260 265 270
 50 Lys Leu Lys Ser Ile Asn Pro Pro Cys Val Pro Phe Phe Gly Ile Tyr
 275 280 285
 Leu Thr Asn Ile Leu Lys Thr Glu Glu Gly Asn Asn Asp Phe Leu Lys
 290 295 300
 55 Lys Lys Gly Lys Asp Leu Ile Asn Phe Ser Lys Arg Arg Lys Val Ala
 305 310 315 320
 Glu Ile Thr Gly Glu Ile Gln Gln Tyr Gln Asn Gln Pro Tyr Cys Leu
 325 330 335
 60 Arg Ile Glu Pro Asp Met Arg Arg Phe Phe Glu Asn Leu Asn Pro Met
 340 345 350

Gly Ser Ala Cys Glu Lys Glu Phe Thr Asp Tyr Leu Phe Asn Lys Ser
 355 360 365
 5 Leu Glu Ile Glu Pro Arg Asn Cys Lys Gln Pro Pro Arg Phe Pro Arg
 370 375 380
 Lys Ser Thr Phe Glu Leu Lys Glu Pro Gly Ile Arg Pro Asn Ala Gly
 385 390 395 400
 10 Arg His Gly Glu Thr Ser Gly Thr Arg Gly His Pro Thr Pro Leu Glu
 405 410 415
 Arg Glu Pro Tyr Lys Ile Glu Phe Glu Arg Ile Ala Glu Thr Glu Leu
 420 425 430
 15 Glu Ser Thr Val Ser Ala Pro Thr Ser Pro Asn Thr Pro Ser Thr Pro
 435 440 445
 20 Pro Val Ser Ala Ser Ser Asp His Ser Val Phe Leu Asp Val Asp Leu
 450 455 460
 Asn Ser Ser His Gly Ser Asn Thr Ile Phe Ala Pro Val Leu Leu Pro
 465 470 475 480
 25 Lys Ser Lys Ser Phe Phe Ser Ser Cys Gly Ser Leu His Lys Leu Ser
 485 490 495
 Glu Glu Pro Leu Ile Pro Pro Pro Leu Pro Pro Arg Lys Lys Phe Asp
 500 505 510
 30 His Asp Gly Ser Asn Ser Lys Gly Asn Met Lys Ser Asp Asp Asp Pro
 515 520 525
 35 Pro Ala Ile Pro Pro Arg Gln Pro Pro Pro Pro Lys Val Lys Pro Arg
 530 535 540
 Val Pro Val Pro Thr Gly Ala Phe Asp Gly Pro Leu His Ser Pro Pro
 545 550 555 560
 40 Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Pro Asp Thr Pro Pro Pro Val Pro
 565 570 575
 Leu Arg Pro Pro Glu His Phe Ile Asn Cys Pro Phe Asn Leu Gln Pro
 580 585 590
 45 Pro Pro Leu Gly His Leu His Arg Asp Ser Asp Trp Leu Arg Asp Ile
 595 600 605
 50 Ser Thr Cys Pro Asn Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ser Thr Pro Ser Pro
 610 615 620
 Arg Val Pro Arg Arg Cys Tyr Val Leu Ser Ser Ser Gln Asn Asn Leu
 625 630 635 640
 55 Ala His Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Pro Arg Glu
 645 650

60 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 41 bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GATATCGAAT TCCGIGTIYT IAAYGTIYTI MGICAYTGGG T

41

15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 34 bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

30

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAGCTTGAAT TCCKIMKYTT ISWRAARTTI AKIA

35

34

REVENDICATIONS

1. Peptide caractérisé en ce qu'il ralentit ou inhibe l'échange du GDP sur le complexe p21-GDP.
2. Peptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou
5 partie des séquences SEQ ID n° 2, 3, 4, 6 ou 8 ou d'un dérivé de celles-ci.
3. Peptide comprenant tout ou partie des séquences SEQ ID n° 2, 3, 4, 6 ou 8 ou d'un dérivé de celles-ci.
4. Anticorps ou fragment d'anticorps dirigé contre un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
- 10 5. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il est dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID n° 1.
6. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il possède la capacité d'inhiber au moins partiellement l'échange du GDP sur le complexe p21-GDP.
- 15 7. Séquence nucléotidique codant pour un peptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 3.
8. Séquence nucléotidique selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
 - (a) tout ou partie des séquences SEQ ID n° 1, 5 ou 7 ou de leur brin
20 complémentaire,
 - (b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide selon l'invention, et
 - (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.
- 25 9. Séquence antisens capable d'inhiber au moins partiellement la production de peptides selon la revendication 3.
10. Séquence nucléotidique capable de s'hybrider avec une séquence selon les revendications 7 ou 8 ou avec l'ARNm correspondant.

11. Utilisation d'une séquence selon la revendication 10 pour la détection de l'expression du facteur d'échange du GDP ou pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc).
12. Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3
5 pour la réalisation d'un composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable de moduler les niveaux d'échange du GDP sur des complexes p21-GDP, par détermination des éléments structuraux de ce peptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.
13. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au
10 moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 3 et/ou un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'une des revendications 4 à 6 et/ou une séquence nucléotidique selon la revendication 8 et/ou un composé préparé selon la revendication 12.
14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 destinée à
15 moduler l'activation des protéines p21.
15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 destinée à inhiber au moins partiellement l'activation des protéines p21.
16. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 destinée au traitement des cancers.
17. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'une des
20 revendications 4 à 6 et/ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 10 pour la détection de l'expression et/ou d'une surexpression d'un facteur d'échange di GDP amplifié, muté ou réarrangé dans un échantillon biologique.
18. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'une des
25 revendications 4 à 6 et/ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 10 pour le typage de cancers.
19. Procédé de préparation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule contenant une
30 séquence nucléotidique selon la revendication 7 dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le peptide produit.

1/3

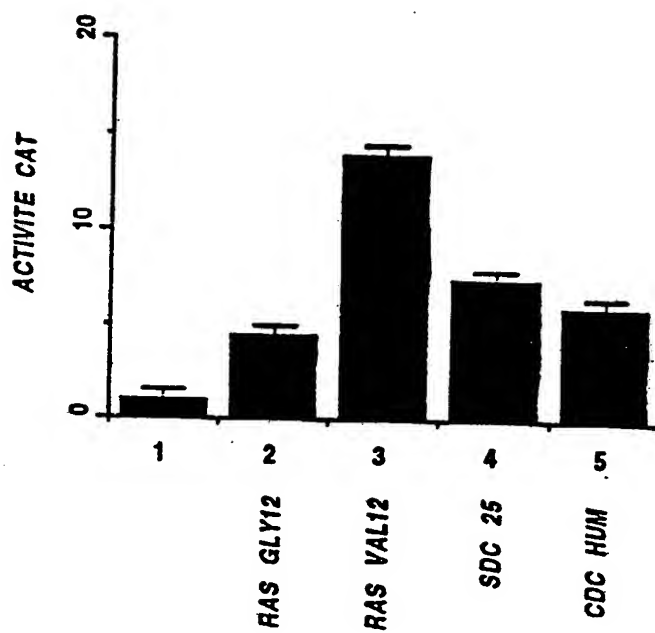


FIGURE 1

2/3

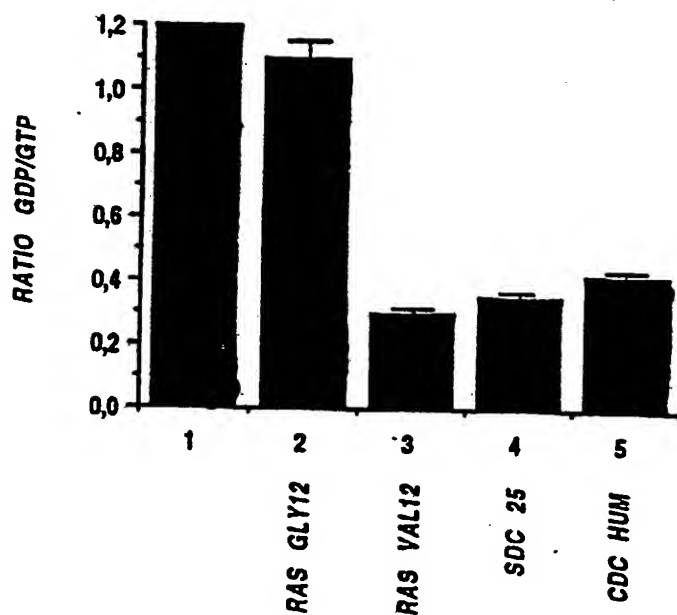


FIGURE 2

3/3

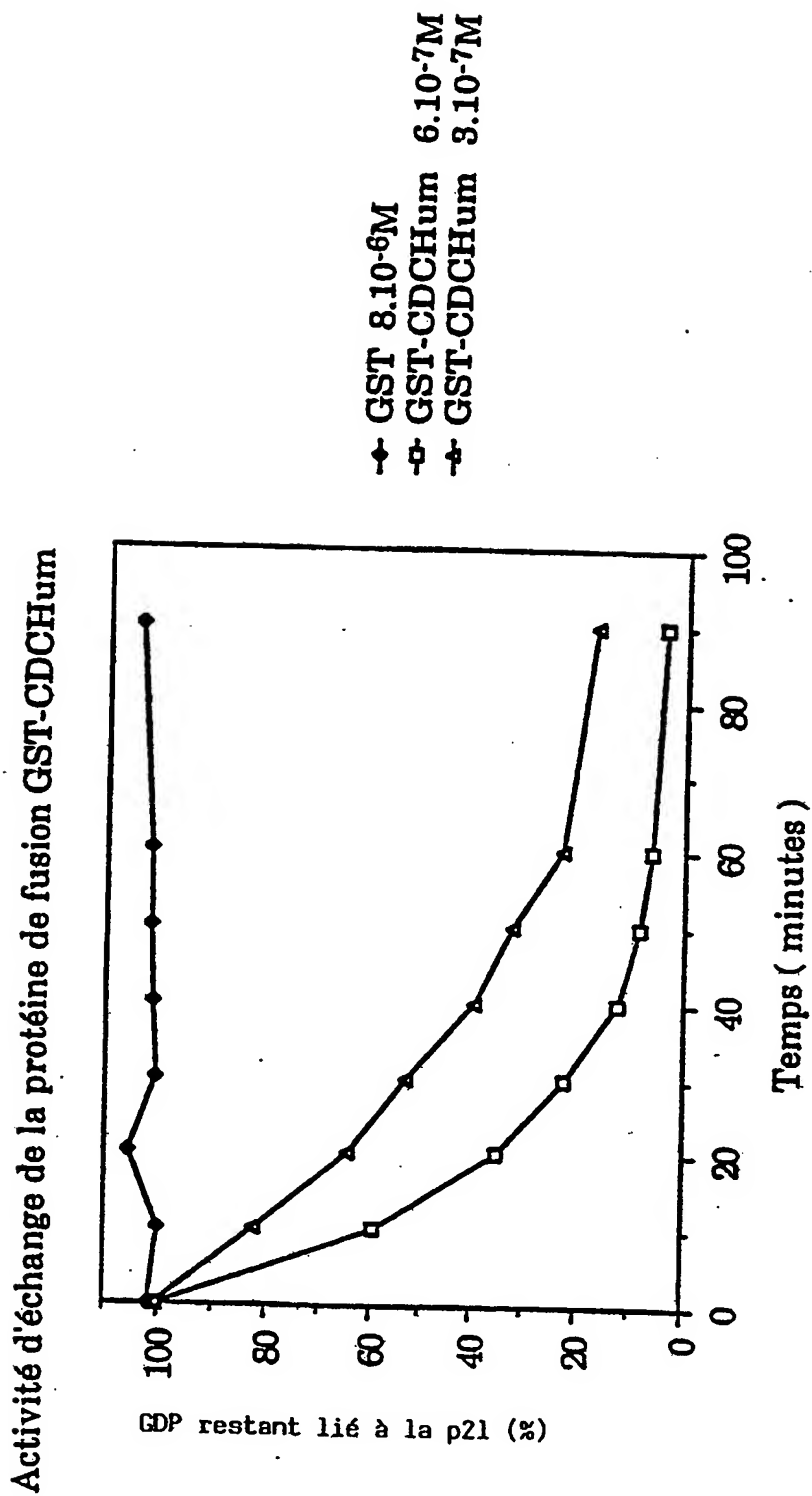


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C12N15/12; C07K13/00; C12P21/08; A61K37/02
 A61K39/395; G01N33/577; C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ G07K ; A61K ; C12N ; C12P
 G01N ; C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ONCOGENE vol. 5, No. 9, September 1990, pages 1321 - 1328 YASUO FUKUMOTO ET AL. 'Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins' see abstract see page 1321, left-hand column, paragraph 1- right-hand column, paragraph 1 see page 1321, right-hand column, paragraph 3 - page 1323, left-hand column, paragraph 2 see page 1325, right-hand column, paragraph 2 - page 1326, left-hand column, paragraph 1</p> <p>./.</p>	1, 7, 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 1993 (13.08.93)

Date of mailing of the international search report

27 August 1993 (27.08.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00382

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 10, No. 8, August 1990, WASHINGTON US pages 4116 - 4122 YASUSHI MATSUI ET AL. 'Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein' see abstract see page 4116, right-hand column, paragraph 2 - page 4117, left-hand column, paragraph 1; figure 2 see page 4120, right-hand column, paragraph 2 - page 4121, right-hand column, paragraph 3</p>	1,7,20
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. 16B, 8 February 1992, page 220 RENATA ZIPPET ET AL. 'CDC25 proteins in growth regulation and signal transduction in yeast and mammalian cells' cited in the application see abstract H 362</p>	1,8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00382

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
CIB 5 C12N15/12; A61K39/395;	C07K13/00; G01N33/577;	C12P21/08; C12Q1/68	A61K37/02
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée ⁸			
Système de classification	Symboles de classification		
CIB 5	C07K ; A61K ; C12N ; C12P G01N ; C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté			
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰			
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³		No. des revendications visées ¹⁴
X	<p>ONCOGENE vol. 5, no. 9, Septembre 1990, pages 1321 - 1328 YASUO FUKUMOTO ET AL. 'Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins' voir abrégé voir page 1321, colonne de gauche, alinéa 1 - colonne de droite, alinéa 1 voir page 1321, colonne de droite, alinéa 3 - page 1323, colonne de gauche, alinéa 2 voir page 1325, colonne de droite, alinéa 2 - page 1326, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>		1,7,20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document antérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinente, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque la document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>			
IV. CERTIFICATION			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
13 AOUT 1993		27 -08- 1993	
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		MONTERO LOPEZ B.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 10, no. 8, Août 1990, WASHINGTON US pages 4116 - 4122 YASUSHI MATSUI ET AL. 'Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein' voir abrégé voir page 4116, colonne de droite, alinéa 2 - page 4117, colonne de gauche, alinéa 1; figure 2 voir page 4120, colonne de droite, alinéa 2 - page 4121, colonne de droite, alinéa 3</p>	1,7,20
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. 16B, 8 Février 1992, page 220 RENATA ZIPPEL ET AL. 'CDC25 proteins in growth regulation and signal transduction in yeast and mammalian cells' cité dans la demande see abstract H 362</p>	1,8